

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

19 AUG 2004



REC'D 06 JUN 2003

WIPO PCT

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:** 102 20 474.8**Anmeldetag:** 7. Mai 2002**Anmelder/Inhaber:** Dr. Hans-Günther M a c h e n s , Lübeck/DE**Bezeichnung:** Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese**IPC:** A 61 K 38/18**Bemerkung:** Die vollständige Seite 15 der Beschreibung ist am 10. Mai 2002 eingegangen.**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 17. April 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
 Im Auftrag

**BEST AVAILABLE COPY**

Neue Deutsche Patentanmeldung  
Günther Machens

---

10 Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese.

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese (Blutgefäßneubildung), ein Verfahren  
15 zu dessen Herstellung sowie dessen Verwendung.

Ein Grundprinzip allen Lebens ist die Aufrechterhaltung eines intra- und extrazellulären Steady-State-Zustandes sowie eines physiologischen Fließgleichgewichtes. Jegliche Unterbrechung  
20 und Störung in der Erhaltung dieses Gleichgewichtes gefährdet und zerstört schließlich das Leben der Zelle. In allen höher entwickelten Organismen spielt der Blutfluß eine zentrale Rolle zur Sicherung der Zellfunktion. Die Versorgung mit Sauerstoff und energiereichen Substraten sowie der Abtransport  
25 von Metaboliten muß den sich ständig verändernden Bedingungen angepaßt werden. Physiologische Veränderungen der Gewebedurchblutung, gleich, ob es sich um eine Erhöhung oder Verminderung handelt, müssen den veränderten energetischen Anforderungen der Zelle äquivalent sein und dürfen auf keinen  
30 Fall unterbrochen werden. Geschieht dies dennoch, führt eine solche Veränderung über kurz oder lang zum Zelluntergang.

Eine Möglichkeit des Organismus, dem erhöhten Energiebedarf der Zellen gerecht zu werden, besteht neben der Öffnung zuvor noch von der Durchblutung ausgeschalteten Gefäßen in der Ausbildung neuer mikrozirkulatorischer Bahnen. Dieser letztere Prozess wird dann in Gang gesetzt, wenn keine abrupte Unterbrechung des Steady-State erfolgt, sondern der vermehrte Energiebedarf langsam genug einsetzt, so daß dem Organismus noch Zeit zur Ausbildung neuer Kapillaren verbleibt. Dieser Vorgang wird Angiogenese genannt und erfolgt, wie jede andere Zellteilung im Organismus auch, vom ersten Moment des embryonalen Lebens an bis zum Tode des Gesamtorganismus. Es handelt sich dabei um einen biologischen Mechanismus, bei dem neue Kapillaren gebildet werden durch Aktivierung, Migration und Proliferation von Endothelzellen aus vorbestehenden Endothel-Perizytenverbänden. Aussprossungen der aktivierten Endothelzellen dringen dabei in das Bindegewesstroma ein durch eine partielle Desintegration der Basalmembran im Muttergefäß als ersten Schritt. Die Migration der Endothelzelle wird normalerweise richtungsbestimmt durch einen angiogenetischen Stimulus und unterstützt durch eine Proliferation der benachbarten Endothelzellen. Nach Ausbildung eines Lumens und Fusion zweier benachbarter aussprossender Endothelzellen beginnt der Blutfluß durch die neu gebildete Kapillare. Werden die beschriebenen angiogenetischen Prozesse rechtzeitig vom Körper initiiert, so kann eine drohende Ischämie, also eine Mangelversorgung der abhängigen Gewebeanteile des Körpers durch Blut, vermieden werden. In vielen Fällen jedoch ist dieser Mechanismus nicht ausreichend, so dass das ischämisch gefährdete Gewebe abstirbt (z.B. Herzinfarkt/akute Ischämie oder diabetisches Ulkus/chronische Ischämie).

Im Zeitalter der Gentechnologie ergibt sich hier ein völlig neuer therapeutischer Zugang zu diesem Problem, nämlich durch Induktion einer Neovaskularisation mittels Zelltransduktion zur Produktion angiogenetisch wirksamer Faktoren im betroffenen Gewebe.

Überraschenderweise gibt es in der Plastischen Chirurgie bisher nur wenig experimentelle Ansätze, um überhaupt die Möglichkeiten des Gentransfers für diesen Bereich zu nutzen. In den bisher erschienenen Arbeiten zur experimentellen und klinischen Transduktion von Zellen zur Produktion angiogenetisch wirksamer Faktoren war bisher noch keine direkte Relevanz für den Bereich der Plastischen Chirurgie aufgezeigt worden. Dabei dürfte die mögliche therapeutische Bedeutung solcher angiogenetisch wirksamer Substanzen gerade in diesem Bereich der Chirurgie unbestritten sein. Eine gesteuerte Einflußnahme auf die Wundheilung und das Überleben von Gewebe durch Gefäßinduktion würde nicht nur direkte klinische Bedeutung haben, sondern auch ein neues wissenschaftliches Feld zum Studium und besseren Verständnis mikrozirkulatorischer Phänomene im Gewebe unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen eröffnen.

Andererseits lassen sich durch die Gentechnologie auch antiangiogenetische Therapieansätze finden, nämlich dann wenn es gilt, die Durchblutung im Gewebe zu reduzieren, ja sogar zu unterbrechen. Das kann jedoch nur der Fall sein, wenn das entstehende Gewebe nicht erwünscht ist, wie im Falle der Bildung benigner und maligner Tumoren. In diesem Fall kann durch antiangiogenetische Maßnahmen die Durchblutung solcher Tumoren derart verschlechtert werden, dass die Tumoren schließlich kleiner werden oder sogar ganz absterben. In der Onkolo-

gie liegen dazu sehr viele therapeutische Ansätze vor, die sich aber von dem hier beschriebenen unterscheiden.

Erfindungsgemäß wird ein Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese vorgeschlagen, daß isogene oder autologe Körperzellen umfaßt, die mindestens ein angiogenetisches oder antiangiogenetisches Protein exprimieren. Isogene Zellen im Sinne der Erfindung sind genetisch identische Zellen, die zu keiner Immunkompatibilität nach Retransplantation in einen isogenen Organismus führen. Autologe Zellen sind solche Körperzellen, bei denen Spender und Empfänger ein und derselbe Organismus sind.

Nach einer Ausführungsform der Erfindung ist in dem erfundungsgemäßen Mittel das mindestens eine angiogenetische Protein unter PDGF-A (platelet derived growth factor A), PDGF-B (platelet derived growth factor B), VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGF $\beta$  (tumor growth factor beta), Angiopoetin 1 und Angiopoetin ausgewählt.

Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist in dem erfundungsgemäßen Mittel das mindestens eine antiangiogenetische Protein unter VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor 1), Angiostatin, Endostatin sowie Rezeptorenblockern für VEGFR1 und VEGFR2 ausgewählt.

Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren zur Herstellung eines erfundungsgemäßen Mittels bereit, bei dem

a) in einem Körper durch Implantation von biologisch inertem Material, z.B. Silastik, die Bildung von isogenen oder autologen Zellen ausgelöst wird,

- b) die in Schritt a) gebildeten Zellen aus dem Körper gewonnen werden,
- c) die in Schritt b) gewonnenen Zellen gentechnisch, z.B. durch retroviralen, insbesondere adenoviralen, Gentransfer,  
5 so verändert werden, daß sie im Falle einer gewünschten Induktion einer Angiogenese mindestens ein angiogenetisches Protein oder im Falle einer gewünschten Inhibition einer Angiogenese mindestens ein antiangiogenetisches Protein exprimieren.

Ein biologisch inertes oder metabolisch inertes Material ist ein Material, welches nicht an den Stoffwechselprozessen des Körpers teilnimmt, aber trotzdem eine zelluläre Reaktion auslösen kann (Ansammlung von Fibroblasten). Wenn ein solches  
15 Material (z.B. Silastik) implantiert wird, dann bildet sich innerhalb von wenigen Tagen (5-7) eine bindegewebige Kapsel um das Implantat, welche die gewünschten Fibroblasten enthält. Diese Kapsel mitsamt Fibroblasten kann man entnehmen und nach Trypsinisierung des Materials die Fibroblasten isolieren und kultivieren. Diese Fibroblasten können isogen sein. Das heißt, sie stammen von einem isogenen Spendertier, welches die gleichen genetischen Eigenschaften hat wie die Tiere, in die dann später die genetisch modifizierten isogenen Fibroblasten retransplantiert werden. Die Alternative  
25 (und das ist klinisch am sinnvollsten) besteht darin, dass man die Fibroblasten aus dem Patienten gewinnt, dem man später diese Zellen nach genetischer Modifikation auch wieder retransplantieren möchte. In diesem Falle würde es sich um autologe Zellen handeln, also Zellen, bei dem Spender und  
30 Empfänger identisch sind

Nach einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens exprimieren die in Schritt c) gewonnenen Zellen ein unter unter PDGF-A (platelet derived growth factor A), PDGF-B (platelet derived growth factor B), VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGFbeta (tumor growth factor beta), Angiopoetin 1 und Angiopoetin ausgewähltes angiogenetisches Protein.

Nach einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens exprimieren die in Schritt c) gewonnenen Zellen ein unter VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor 1), Angiostatin, Endostatin sowie Rezeptorenblockern für VEGFR1 und VEGFR2 ausgewähltes antiangiogenetisches Protein.

15 Die Erfindung gibt ferner die Verwendung eines erfindungsgemäßen Mittels oder eines nach einem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Mittels zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese an.

Nach einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung wird ein erfindungsgemäßes Mittel oder ein nach einem erfindungsgemäßen Verfahren hergestelltes Mittel in isogenes oder autologes Gewebe des Körpers eingeführt, in dem eine Angiogenese induziert oder inhibiert werden soll.

25

Das erfindungsgenäß Mittel eignet sich z.B. bei Diabetikern zur Behandlung von schlecht heilendem Ulkus oder zur Behandlung von Patienten mit peripherer arterieller Verschlußkrankheit (pAVK) durch Vermehrung der Blutgefäßneubildung. In akuten Fällen von Mangeldurchblutung (z.B. beim Herzinfarkt) kann das Mittel ebenfalls eingesetzt werden. Zur Behandlung von Tumoren, besonders auch solchen, die auf einer Entartung

der blutgefäßbildenden Zellen beruhen, kann das erfindungs-  
mäße Mittel antiangiogenetisch eingesetzt werden. Weiterhin  
ist das antiangiogenetische Mittel überall dort einsetzbar,  
wo eine lokale antiangiogenetische Behandlung von Tumoren  
5 sinnvoll und möglich erscheint (z.B. noch nicht metastasierte  
Malignome).

Im folgenden wird die Erfindung ohne Beschränkung des An-  
spruchswortlauts unter Bezugnahme auf konkrete Ausführungs-  
formen und Arbeitsbeispiele detaillierter beschrieben.

In einer Reihe von experimentellen Untersuchungen hat der Er-  
finder festgestellt, daß nach beispielsweise retroviralem  
Gentransfer von isogenen Fibroblasten der Ratte (GMFB) diese  
15 in vitro eine stabile Integration zum Beispiel des humanen  
Gens PDGF-A aufweisen. In vitro konnte dadurch eine bis zu  
560-fach höhere Konzentration von zum Beispiel PDGF-AA, ver-  
glichen mit nicht genetisch modifizierten Fibroblasten (NMFB)  
erreicht werden.

Weiterhin konnte erstmals in vivo gezeigt werden, daß GMFB  
wie auch NMFB nach Transplantation in einem epigastrischen  
Insellappenmodell der Ratte nachweisbar vital bleiben. Das  
durch GMFB produzierte PDGF-AA führte dann unter ischämischen  
25 Bedingungen in dem beschriebenen Modell zu einer sich inner-  
halb von 7 Tagen nach Transplantation manifestierenden Angio-  
genese und damit zu einer signifikant höheren Überlebensrate  
von ischämisch gefährdetem Lappengewebe.

30 In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, daß die be-  
schriebenen angiogenetischen Effekte von PDGF-AA ischämieab-  
hängig sind und unter Normalbedingungen im nicht ischämisch

gefährdeten Gewebe nicht auszulösen sind. Weitere Untersuchungen, in denen auf gentechnologische Zellmanipulationen verzichtet und statt dessen einmalige Bolusgaben von zum Beispiel VEGF165 sowie des selektiven VEGF165-Antagonisten sFLT-  
5 1 D1-D6 verwendet wurden, erbrachten zwar angiogenetische Effekte, die jedoch weit hinter den Ergebnissen der PDGF-AA-Effekte durch retroviral modifizierte Fibroblasten zurückblieben. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß der in vom im Labor des Erfinders produzierte Antagonist sFLT-1 D1-D6 klinisch eine inhibitorische Wirkung auf VEGF165 hat.

Die bisher gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß in ischämischen Situationen eine funktionelle Angiogenese am ehesten durch eine temporäre Genexpression in vivo sinnvoll  
15 ist, wobei zunächst eine Induktion von VEGF165 und kombiniert mit sFLT-1 D1-D6 als selektiver Antagonist zur Negativkontrolle erfolgen soll.

## Material und Methoden

### Zellkulturen und deren genetische Modifikation

5 Fibroblasten: aus autologen Inbred-Rattenstämmen (weibliche Lewis-CRL-Ratten, Gewicht 200-215 Gramm; Charles River Laboratorien) gewonnene Fibroblastenkulturen

Virusproduzierende Zelllinie: amphotrophe psi-CRIP-Verpackungszelllinie, die von murinen NIH-3T3-Fibroblasten abstammt, welche die viralen Genprodukte gag, pol und env exprimieren (R.Mulligan, Whitehead Institute of Biomedical Research, Cambridge, Mass. sowie W. Lindenmaier, Gesellschaft für Biotechnologische Foschung/Baunschweig). Transduktion der psi-CRIP Verpackungszelllinie mit MFG Plasmid DNS, Klonierung derselben und Screening der Zelllinie, welche die höchsten Vironentiter produziert (J.R.Morgan, Shriners Burns Research Laboratories,Cambridge,Mass. sowie W. Lindenmaier, Gesellschaft für Biotechnologische Foschung/Baunschweig)

15 Fibroblasten-Zellkulturmedium: Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM, hochprozentige Glucose, L-Glutamin, Natriumpyruvat 110 mg/L von Gibco BRL/ USA), FBS (fetal bovine serum = fetales Rinderkalbserum) 10 % (Fa. HtClone/ USA), Penicillin-Streptomycin 100IU/ml-100microl/ml (Fa. Böhringer), BCS (bovine calf serum = bovines Rinderkalbserum) 10 % (Fa. 25 HtClone/USA)

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) bestehend aus 138 mM NaCl, 2,7 M KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, sterilisiert über einen 0,45-Mikrometer-Filter

EDTA - Lösung (genannt 'Versene') (=ethylenedinitriol)-tetraacetic acid disodium Salz, Fa. Boehringer): 5 mM in PBS aufgelöst und über einen 0,45-Mikrometer-Filter sterilisiert

5 Trypsinlösung (Trypsin 1-300, Fa. ICN Biochemicals), bestehend aus 0,1 % D-Dextrose (w/v) und Trypsin 0,1 % (w/v) in PBS bei einem pH von 7,5

Aufbewahrungsflasche für Trypsin (25 ml , Fa. Wheaton Scientific)

Polybrene (Fa. Sigma/USA)

DMSO (Dimethyl-Sulphoxid; Fa Sigma-Aldrich; Irvine/England)

15

Versuchstiere und operatives Vorgehen

400 autologe Lewis-Ratten (Inbred-Stämme; weiblich) aus den Charles River Laboratories (Pittsfield NH/USA). Alle Tierversuche erfolgen streng nach den hierfür vorgesehenen Protokollarien des Universitätsklinikums Lübeck.

Silastikfolie (0,0127 mm Durchmesser; PharmElast, SF Medical Hudson MA/USA)

25

Halskragen für Ratten als Autokannibalismusschutz (Fa. Kent Scientific/Litchfield, CT/USA)

Operationsinstrumentarium incl. Mikrobesteck

30

Aethyläther (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA)

Ketamin (Ketanest 100 mg/ml; Fort Dodge Laboratories, Iowa/USA)

Xylazin (Rampun 20 mg/ml; Bayer Corporation, Kansas/USA).

5

Betadine

#### Immunoassays und ELISA

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (R&D Systems, Minneapolis/USA).

ELISA für VEGF-165, sFLT-1, PDGF-B und bFGF aus dem Labor Dr. Weich/GBFBraunschweig

15    Histologiefärbungen und Immunhistochemie

Haematoxylin-Eosin

Anti-Human von Willebrand Factor, IgG Fraction (Fa. Sigma, St.Louis, MO/USA)

FITC Conjugate, Anti-IgG (Fa. Sigma, St.Louis, MO/USA)

20    VEGF165-mRNS-Analyse

Die Methoden zur VEGF-mRNA - Quantifizierung sind ansich bekannt (kompetitive RT-PCR, Northern blot).

25    Fibroblastenproduktion

Autologe Rattenfibroblasten werden in 5 Tieren des oben genannten Rattenstammes gezüchtet als spätere Trägerzellen zur Expression des gewünschten Gen. Die Tiere werden hierfür  
30 anästhesiert durch intraperitoneale Injektion z.B. einer Kombination aus 0,05 mg/gm Ketamin (Ketanest 100 mg/ml; Fort Dodge Laboratories, Iowa/USA) und 0,0013 mg/gm Xylazin (Ram-

pun 20 mg/ml; Bayer Corporation, Kansas/USA). Die spontan atmenden Tiere werden von Xyphoid bis zur Leistenregion rasiert und auf einen Operationstisch plaziert.

5 Die Körpertemperatur wird während eines jeden Experiments mittels eines digitalen Rektalthermometers gemessen und über eine Wärmematte bei 36 - 37 Grad Celsius konstant gehalten. Nach sterilem Abwaschen des Operationsgebietes erfolgt vom Xyphoid entlang der Linea alba nach caudal hin ein Schnitt mit dem 10er Skalpell, wobei nur die Haut und das subcutane Fettgewebe durchtrennt und die Faszie der Rektusmuskulatur belassen wird, um anschließend unter sorgfältiger Schonung der epigastrischen Hautgefäße nach beidseits lateral hin eine ungefähr 4 x 5 cm große Wundtasche zu schaffen.

15 In diese Tasche hinein wird eine ebenso große Silastikmembran (Silastik ist nur ein Beispiel für ein geeignetes Material, das nach der Implantation die Bildung von isogenen Fibroblasten bewirkt und sonst keine weiteren Nebenwirkungen hat) (PharmElast; SF Medical) plaziert und durch subcutane Ecknähte (6-0 Ethilon) fixiert. Diese Membran hat eine Dicke von z.B. 0,0127 mm, ist besonders weich, äußerst flexibel und wird steril verpackt geliefert. Vor Implantation der Folie wird diese steril gewaschen. Nach Fixieren der Folie in situ 25 erfolgt der Wundverschluß durch eine intracutane laufende 6-0 Ethilonnaht mit Versenken der Eckknoten.

Die Tiere werden über 7 Tage täglich beobachtet bei freiem Zugang zu Wasser und Nahrung, um frühzeitig Probleme in der 30 Wundheilung aufdecken zu können. Nach diesem Zeitraum werden die Tiere wie zuvor beschrieben betäubt und die Silastikmembran, die als Fremdkörper die lokale Fibroblastenproduktion

anregen sollte, mitsamt dem sich darum gebildeten Narbengewebe entfernt. Die Tiere werden eingeschläfert mittels einer intraperitonealen Überdosis des genannten Anästhesiegemisches.

5

#### Fibroblastenseparation und -züchtung

Das operativ gewonnene Fibroblastenkonglomerat wird sofort in DMEM bei 4 Grad Celsius bewahrt und einer möglichst raschen Verarbeitung unterzogen. Das Material wird unter sterilen Bedingungen von der Silastikmembran abgelöst. Sämtliche Arbeiten mit der Fibroblastenkultur finden in einem Labor gentechnische Sicherheitsstufe 2 statt mit Luftabzug an jedem sterilen Arbeitsplatz.

15 Das Material wird nun einer ausgiebigen Waschung unterzogen in insgesamt 10 Plastikbehältern mit jeweils 10 ml PBS (phosphatgepuffertes Kochsalz 0,9 %). Jeder Behälter kann steril verschlossen werden, so daß das Fibrozytenkonglomerat 10 x 60 Sekunden lang kräftig im PBS geschüttelt werden kann. Nach zweimaligem Waschen wird das Gewebe noch einmal entnommen, um letzte Bindegewebsreste und Silasikanteile, die sich demarziert haben, unter sterilen Kautelen zu entfernen.

25 Danach wird das Material in eine sterile 25 ml Monovette gegeben und mit 5 ml Trypsin und 5 ml EDTA über 5 Minuten enzymatisch behandelt, um die Fibroblasten aus dem Kollagenverband zu lösen. Die Zellen werden durch sterile Gaze gefiltert und anschließend in DMEM mit 20 %igem FBS gewaschen, um die Trypsinaktivität zu neutralisieren. Die so gewonnene Suspension wird bei 800 U/min über 5 Minuten zentrifugiert. Die Fibroblasten setzen sich am Boden ab und werden mit 10 ml DMEM aufgemischt.

20 Mikroliter der Suspension werden in einem Zellzähler (Hämocytometer) ausgezählt und der Überstand anschließend abpipettiert. Die Zellen werden dann in Brutkammern mit 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche mit einer Aussaat von  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> gezüchtet. Die Züchtung erfolgt in einem Medium aus DMEM, versetzt mit 100 Mikrogramm/ml Streptomycin, 100 IU/ml Penicillin, 3 Mikroliter/ml Amphotericin, 5 % FBS und 10 Mikrogramm/ml Ascorbinsäure, welche täglich zu dem Nährmedium dazugegeben wird. Das Nährmedium selbst wird alle 3 Tage gewechselt, da die Fibroblasten sich durchschnittlich einmal pro 16-18 Stunden teilen und einen entsprechenden Energiemetabolismus haben.

Wenn die Fibroblasten nahezu konfluieren, wird eine erneute Zellseparation durchgeführt. Die solchermaßen gewonnenen Zellen können anschließend neu ausgesät werden zur weiteren Züchtung neuer Zellen oder auch asserviert und eingefroren werden. Dies erfolgt durch Zellseparation und anschließende Suspension in DMEM mit 10 % FBS und entsprechendem Antibiotikazusatz. Im Falle einer Asservierung von CRIP - Zellen werden diese allerdings mit BCS-Medium suspensiert. Dem Medium wird als Kryoprotektivum die Substanz DMSO in einem Mischungsverhältnis von 1:10 beigefügt. Pro ml Medium sollten dann zwischen  $1 \times 10^6$  Zellen enthalten sein. Anschließend werden jeweils 1-2 ml Medium/Container abgefüllt und für 24 Stunden bei - 20 Grad Celsius eingefroren. Am folgenden Tage werden die Container dann in - 80 Grad Celsius tiefgefroren, um wiederum 24 Stunden später in flüssigem Stickstoff bei - 196 Grad Celsius zu verbleiben. Durch dieses schrittweise Einfrieren wird die Ausbildung von Eiskristallen in der Suspension mit daraus folgender Zellschädigung vermieden.

10 Der erste Schritt beim Gentransfer besteht in der Produktion eines rekombinanten Virus, welcher das zu transferierende Gen encodiert. In diesen Experimenten wird eine cDNA, welche das interessierende Protein encodiert, mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifiziert. Die entsprechenden Primer produzieren z.B. einen BspH1-Locus am Translations-Startercodon und z.B. einen BamH1-Locus am Translations-Stopcodon. Das Produkt der PCR kann dann isoliert werden durch Auftrennen des Genproduktes an den genannten Stellen und Insertion des gewonnenen Genes in die Ncol/BamH1 Loci eines viralen Vektors, genannt MFG. Die erfolgreiche Übertragung wird anschließend durch DNS-Sequenzierung überprüft.

25 Dieser Vektor (MFG-Plasmid DNS) stammt z.B. aus dem murinen Moloney Leukämie-Virus, enthält selbst keine viralen Gene außer denen, die zur Transkription, Verpackung, reversen Transkription, Integration und Expression des viralen Vektors mit dem darin befindlichen modifizierenden Gen notwendig sind. Um nun Virionen produzieren zu können, die diesen Vektor in Zielzellen genetisch verankern können, muß der Vektor 30 in eine spezielle Verpackungzelllinie, welche z.B. von murinen 3T3 Fibroblasten stammt, integriert werden. Die Transduktion des Vektors in die entsprechende Verpackungzelllinie

Produktion rekombinanter Retro- und Adenoviren und Gentransfer in die Fibroblastenkulturen

Sämtliche gentechnischen Arbeiten werden in den dafür vorgesehenen Räumlichkeiten der Sicherheitsstufe 1 und 2 nach den entsprechenden gentechnologischen Laborprotokollen durchgeführt und sind von der zuständigen Behörde für gentechnische Sicherheit genehmigt.

Der erste Schritt beim Gentransfer besteht in der Produktion eines rekombinanten Virus, welcher das zu transferierende Gen encodiert. In diesen Experimenten wird eine cDNS, welche das interessierende Protein encodiert, mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifiziert. Die entsprechenden Primer produzieren z.B. einen BspH1-Locus am Translations-Startercodon und z.B. einen BamH1-Locus am Translations-Stopcodon. Das Produkt der PCR kann dann isoliert werden durch Auftrennen des Genproduktes an den genannten Stellen und Insertion des gewonnenen Genes in die NcoI/BamH1 Loci eines viralen Vektors, genannt MFG. Die erfolgreiche Übertragung wird anschließend durch DNS-Sequenzierung überprüft.

Dieser Vektor (MFG-Plasmid DNS) stammt z.B. aus dem murinen Moloney Leukämie-Virus, enthält selbst keine viralen Gene außer denen, die zur Transkription, Verpackung, reversen Transkription, Integration und Expression des viralen Vektors mit dem darin befindlichen modifizierenden Gen notwendig sind. Um nun Virionen produzieren zu können, die diesen Vektor in Zielzellen genetisch verankern können, muß der Vektor in eine spezielle Verpackungzelllinie, welche z.B. von murinen 3T3 Fibroblasten stammt, integriert werden. Die Transduktion des Vektors in die entsprechende Verpackungzelllinie

wird durch die Zugabe von Calciumphosphat erleichtert, da dadurch die Zellmembranen des Verpackungszelllinien temporär porös werden und dem viralen Vektor leichter Zugang zur Zelle verschaffen. Diese Verpackungszelllinie (Psi- CRI) wurde speziell produziert, um die viralen Proteine pol, env und gag zu liefern, welche ihrerseits Virionen herstellen können, die den Vektor mit dem darin befindlichen modifizierenden Gen kodieren und übertragen. Die Verpackungszelllinie selbst kann keine Viren herstellen, die 'wild type' Replikanten entsprechen und damit virulent sind. Stattdessen transkribiert sie die DNS des rekombinanten viralen Vektors in RNS, welche dann in die RNS des Virions integriert wird. Die Psi- CRP-Verpackungszelllinie scheidet dann das Virion, also den rekombinanten Virus mitsamt modifizierendem Gen in das Zellmedium aus. Eine Transfektion der Zielzellen gelingt effektiv bei einer Menge von 1,0 - 10,0 Mio. Virionen/ml Medium. Es wird deshalb jede transfizierte Zelllinie nach der höchsten Titerproduktion überprüft, um diese dann für den Gentransfer zu selektieren. Für den adenoviralen Gentransfer wird als Cosmidvektorfragment ein padcos46 RESeGFP (39155 bp) verwendet und mit der entsprechenden gewünschten Gensequenz bestückt. Selbstverständlich kann der Vektor so konstruiert werden, daß eine Genexpression nur unter gleichzeitiger Gabe einer weiteren Substanz erfolgt. Damit ist eine zeitlich gesteuerte Expression möglich. Geeignete Vektoren mit sog. "on/off"-Genfunktionen sind im Stand der Technik bekannt.

Für die Transduktion werden die gewonnenen Fibroblasten in Brutkammern mit 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche ausgesät und mit einem Medium aus DMEM, versetzt mit 100 Mikrogramm/ml Streptomycin, 100 IU/ml Penicillin, 3 Mikroliter/ml Amphotericin und 5% FBS. Die Aussaat der Fibroblasten erfolgt in einer niedrigen

Dichte ( $5 \times 10^5$  Zellen), um eine möglichst große Effektivität der Transduktion zu erreichen.

Am Folgetag, wenn alle Fibroblasten Kontakt mit der Bodenfläche der Brutkammer bekommen haben und sich langsam ausbreiten, wird ein Mediumwechsel vorgenommen mit Medium aus der Psi-CRIP Zelllinie. In diesem Medium befinden sich 1,0 - 10,0 Mio Virionen/ml Medium, welche frisch aus dem Medium der Verpackungszelllinie (Psi-CRIP) abpipettiert sind. Das Medium wird hierfür zunächst durch einen Porenfilter mit einem Poren Durchmesser von 0,45 Mikrometern gefiltert, um es von Zelldebris und möglichen Kontaminantien zu befreien. Anschließend wird dem Medium die Substanz Polybrene in einer Konzentration von 8 Mikrogramm/ml beigemischt.

15

Polybrene ist wie Protamin und DEAE-Dextran ein kationisches Polymer, bestehend aus 1,5-Dimethyl-1,5-Diaxadecamethylen-Polymethobromid, und entfaltet seine transfektionsunterstützende Wirkung dadurch, daß es an die Viruspartikel adsorbiert und gleichermaßen auch an die Oberfläche der Zielzelle, um so die elektrostatischen Abstoßungskräfte dieser beiden negativ geladenen Stoffe abzuschwächen. Zur Gewinnung ausreichend großer Mengen an Viruspartikeln müssen die Zellen der Psi-CRIP Zelllinie bereits konfluent sein und ein Mediumwechsel am Vortag der Transduktion stattfinden, um eine möglichst hohe Anzahl von aktiven Viren/ml Medium zu gewährleisten. Die Viren haben bei 37 Grad Celsius im Brutschrank eine durchschnittliche halbzeitliche Lebensdauer von 6-8 Stunden. Die Lebenszeit der Viren kann durch Senken der Brutschranktemperatur auf 32 Grad Celsius bis zum Zehnfachen verlängert und damit die Effektivität der Transduktion erheblich gesteigert werden.

Wenn die rekombinanten Viren im Medium mit Zielzellen zusammenkommen, wird das Virion an der Zelloberfläche der Fibroblasten durch spezielle Rezeptoren gebunden und entläßt das verpackte RNS Genom in das Zellinnere. Diese wird revers transkribiert und die entstehende DNS gelangt in den Zellnukleus, wo sie in das Genom der Zielzelle stabil integriert wird. Diese integrierte Kopie des rekombinanten viralen Vektors mit dem modifizierenden Gen wird an die Tochterzellen weitergegeben wie jedes andere autosomale Gen. Zudem erfolgt eine stabile regelmäßige Expression des Gens, so daß die Zielzellen nunmehr große Mengen des gewünschten Protein sezernieren.

Bei Verwendung adenoviraler Vektoren wird man eine nur temporäre Genexpression erwarten können, welche nach einigen Zellgenerationen wieder aus dem Zellgenom eliminiert werden wird. Das Medium sollte für 24 Stunden mit den Zielzellen zusammen belassen werden, um den Transduktionsvorgang in allen Zellen abgeschlossen zu haben.

Das virusenthaltende Medium kann auch asserviert werden, um es zu einem späteren Zeitpunkt für eine Transduktion von Fibroblasten zu verwenden. Hierzu wird das Medium abpipettiert und auf Trockeneis schockgefroren, bis es eine gelbliche Färbung annimmt. Anschließend wird das Medium bei - 80 Grad Celsius gelagert. Man muß allerdings mit einem Verlust von 30 - 50 % Viren durch diesen Vorgang rechnen.

Das Wachstum der genetisch modifizierten gegenüber den unbehandelten Fibroblasten wird untersucht durch Aussaat von jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen auf 60 mm durchmessende Petrischalen

und Auszählen des Zellen in 12 - stündigem Abstand über insgesamt 4 Tage nach dem oben genannten Verfahren. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die biologische Aktivität des sezernierten Proteins ziehen, da die verwendeten Substanzen mit Ausnahme von sFLT1 D1-D6 auch autokrin mitogen wirken, also die Fibroblasten, welche selbst das Protein sezernieren, zur Zellteilung anregt. Die Anzahl der Fibroblasten wird anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels einer Zählekammer gemessen und die Vitalität der Zellen durch Evans-Blue bestimmt und mit den Kontrollen, welche aus unbehandelten Fibroblasten bestehen, verglichen.

Die Proteinexpression wird außerdem in vitro mittels ELISA-Techniken bestimmt werden. Es wird dabei eine wesentlich höhere Proteinproduktion durch die genetisch modifizierten Fibroblasten erwartet.

Die solchermaßen vorbereiteten Zellpopulationen werden nach Quantifizierung in Medium transportiert zur Durchführung der sich daran anschließenden Operation.

#### Operation

Es werden 2 Untergruppen (I und II) mit jeweils 200 Tieren gebildet. Jede Untergruppe wird wiederum in 5 Subgruppen (I.I - I.V, II.I - II.V) zu jeweils 40 Tieren dividiert. Da 4 verschiedene Faktoren getestet werden sollen (VEGF 165, VEGF 165 + sFLT-1, PDGF-B und bFGF), muß jede Subgruppe wiederum in 4 Untergruppen à 10 Tieren aufgeteilt werden. Das Körpergewicht der Tiere wird während der Versuchstage regelmäßig mittels einer digitalen Waage bestimmt.

In Gruppe I wird 1 Woche vor der eigentlichen Operation jeder Lappen am aetheranästhesierten Tier in einer Ausdehnung von 7 x 7 cm vorgezeichnet und bereits zu diesem Zeitpunkt die Lappenbehandlung vorgenommen.

5

Gruppe I.I erhält im vorgezeichneten Lappenbereich eine subcutane Injektion von 10 Mio. genetisch modifizierten Fibroblasten (GMFB) in 2 ml DMEM mit 10 % FBS. Die Injektion selbst erfolgt mittels einer sterilen 2 ml Spritze mit 0,4 mm durchmessender Stahlkanüle in den Panniculus carnosus zwischen äußerem Faszienblatt der Bauchwand und Subcutis. Gruppe I.II erhält im vorgezeichneten Lappenbereich eine subcutane Injektion von  $10 \times 10^6$  nicht-modifizierter Fibroblasten (NMFB), aufgelöst in 2 ml DMEM mit 10 % FBS. Gruppe I.III erhält eine subkutane Injektion von 2 ml DMEM mit 10 % FBS ohne Zellzusatz. Gruppe I.IV erhält eine subkutane Injektion von 2 ml NaCl 0,9 % ohne Zellzusatz. Genau eine Woche später wird die chirurgische Hebung der solchermaßen vorbereiteten Lappen durchgeführt.

15

In der Gruppe II erfolgt die Lappenbehandlung am Tage der Lappenhebung. Gruppe I.V und Gruppe II.V werden wie die Gruppen I.I und II.I behandelt und dienen Langzeitexperimenten. Diese Tiergruppen werden erst nach einem Beobachtungszeitraum 25 von 6 Monaten (jeweils 5 Tiere) und 12 Monaten (jeweils 5 Tiere) getötet.

30

Das chirurgische Vorgehen ist in allen Untergruppen identisch. Die Tiere werden anästhesiert durch intraperitoneale Injektion einer Kombination aus 0,05 mg/gm Ratte Ketamin (Ketanest 100 mg/ml; Fort Dodge Laboratories, Iowa/USA) und 0,0013 mg/gm Ratte Xylazin (Rampun 20 mg/ml; Bayer Corporati-

on, Kansas/USA). Die spontan atmenden Tiere werden von Xyphoid bis zur Leistenregion rasiert und auf einen Operationstisch plaziert. Die Körpertemperatur wird während eines jeden Experiments mittels eines digitalen Rektalthermometer gemessen und über eine Wärmematte bei 36 - 37 Grad Celsius konstant gehalten.

In jedem Tier wird ein standartisierter epigastrischer Lappen gehoben mit den Maßen 7 x 7 cm. Zunächst wird dabei die Basis des Lappens vorgeschnitten, die Femoralgefäße auf beiden Seiten aufgesucht und anschließend der Lappen inclusive Haut und Subcutis an den beiden inferioren epigastrischen Gefäßnervenbündeln vollständig gehoben, so daß die Durchblutung des Lappens allein über diese Gefäßstiele gewährleistet bleibt. Die superioren epigastrischen Gefäßstiele werden durchtrennt nach Ligatur mittels 6-0 Ethilonnaht. Ebenso wird auch für jeden Lappen das linksseitige Gefäßnervenbündel unter 2 6-0 Ethilonligaturen durchtrennt, so daß der Lappen nunmehr lediglich über die rechtsseitigen Stielgefäße ernährt wird.

Gruppe II.I und Gruppe II.V erhält im vorgezeichneten Lappenbereich eine subcutane Injektion von  $10 \times 10^6$  genetisch modifizierten Fibroblasten (GMFB) in 2 ml DMEM mit 10 % FBS. Die Injektion selbst erfolgt wie schon für Gruppe I.I beschrieben. Gruppe II.II erhält im vorgezeichneten Lappenbereich eine subcutane Injektion von  $10 \times 10^6$  nicht-modifizierter Fibroblasten (NMFB), aufgelöst in 2 ml DMEM mit 10 % FBS. Gruppe II.III erhält eine subkutane Injektion von 2 ml DMEM mit 10 % FBS ohne Zellzusatz. Gruppe II.IV erhält eine subkutane Injektion von 2 ml NaCl 0,9 % ohne Zellzusatz. Anschließend wird jeder Lappen wieder in sein Wundbett eingenäht. Hierzu werden zunächst 4 Ecknähte sowie 2 Nähte in der Medianlinie

mit einer 6-0 Ethilonnaht gesetzt und anschließend der ganze Lappen durch eine laufende 6-0 Ethilonnaht intracutan mit Versenken der Knoten eingenäht.

5 Alle Tiere erhalten postoperativ einen Halskragen (Fa. Kent Scientific), um sie vor Autokannibalismus zu schützen. Genau eine Woche nach diesem Eingriff werden die Tiere der Gruppen I.I-I.IV und II.I-II.IV ein letztes Mal operiert. Die Lappen werden auf eine in qmm planimetrisch aufgeteilten Plastikfolie nach ihrem Anteil an vitalem und nekrotischem Lappengewebe übertragen zur späteren computergesteuerten Bildanalyse. Nach anschließendem erneuten Heben der Lappen werden die Lappenpräparate abschließend in ihrer Gesamtheit mit der darunter liegenden Muskelschicht zur weiteren histologischen, 15 immunhistochemischen und m-RNS-analytischen Untersuchung entnommen. Zuletzt werden die Versuchstiere durch eine intraperitoneale Überdosis Ketamin getötet.

6 Monate bzw. 12 Monate nach Zelltransplantation erfolgt in den Tieren der Gruppen I.V und II.V die histologische und immunhistochemische Evaluation der Langzeitergebnisse, um die Dauerfolgen nach einer gentechnologischen Manipulation im Gewebe näher untersuchen zu können.

25 Sämtliche Operationen finden in den von der UKL dafür vorgesehenen Räumlichkeiten der gentechnischen Sicherheitsstufe 1 statt.

#### Histologie, Immunhistochemie und Gewebeextraktion

30 Die histologische Aufarbeitung der Präparate erfolgt nach Fixation in Formaldehyd und Färbung in Hämatoxylin/Eosin. Die

Präparate werden zuvor in Paraffin eingebettet, mit dem Mikromesser in 5 Mikrometer dünne Schichten geschnitten, in Präparateplatten fixiert und einer entsprechenden Färbung unterzogen. Eine Färbung der Präparate erfolgt getrennt nach 5 Hämotoxylin/Eosin als primäre und Gegenfärbung in der Immunhistochemie.

10 weitere Tiere aus den Gruppen I und II, deren Lappengewebe mit GMFB behandelt wurde, werden nach 6 bzw. 12 Monaten sakrifiziert und das noch verbliebene angiogenetisch veränderte Gewebe einer histologischen Untersuchung unterzogen.

15 Immunhistochemisch wird eine Färbung mittels Immunperoxidase für Faktor VIII (von Willebrand Faktor) mit Antiserum von Kaninchen zur Anfärbung von Endothelzellen sowie eine Chlorazetatesterasefärbung zur Darstellung polymorphonukleärer Zellen durchgeführt. Zusätzlich wird eine Färbung zum Nachweis des sezernierten Proteins im Lappengewebe vorgenommen.

Das frisch entnommene Gewebe wird auf seine Produktionsfähigkeit von produziertem Protein mittels m-RNA-Analyse durch quantitative PCR-Analyse untersucht, um einen Anhalt über die Menge und Dauer der Proteinproduktion durch die GMFB zu bekommen.

25

Die Produktion autologer Zellen zur Retransplantation in demselben Spenderorganismus geschieht nach exakt den gleichen methodologischen Vorgaben, wie sie zuvor geschildert wurden.

Literaturverzeichnis

1. Genetically modified fibroblasts induce angiogenesis in the rat epigastric island flap  
5 Machens HG, Morgan JR, Berthiaume F, Stefanovich P and Berger A  
in: Biological matrices and tissue reconstruction (Ed.: Stark, Horch, Tanczos) pp. 53-59 Springer Verlag/Berlin Heidelberg New York (1997) ISBN 3-54063863-6
2. Genetically modified fibroblasts induce angiogenesis in the rat epigastric island flap  
Machens HG, Morgan JR, Berthiaume F, Stefanovich P, Reimer R and Berger A  
15 Langenbeck's Arch Surg 383: 345-350 (1998)
3. Genetically modified fibroblasts induce angiogenesis in the 3 x 6 cm rat epigastric island flap.  
Machens HG, Morgan J, Weich HE, Berthiaume F, Stefanovich P, Berger A  
Eur J Plast Surg 22: 203-209 (1999)
4. Genetically modified fibroblasts induce angiogenesis in the 3 x 6 cm rat epigastric island flap - authors' reply.  
25 Machens HG, Morgan J, Weich HE, Berthiaume F, Stefanovich P, Berger A  
Eur J Plast Surg 22: 211-212 (1999)
5. Gentherapeutische Techniken und Anwendungsmöglichkeiten in der Plastischen Chirurgie  
30 Machens HG, Morgan JR, Mailänder P  
Focus MUL 17: 3-10 (2000)

6. Gentherapeutische Möglichkeiten in der Plastischen Chirurgie

Machens HG, Morgan JR, Sachse C, Berger A, Mailänder P

Chirurg 70: 176-181 (2000)

Patentansprüche

1. Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese, daß isogene oder autologe Körperzellen umfaßt, die mindestens ein angiogenetisches oder antiangiogenetisches Protein exprimieren.
2. Mittel nach Anspruch 1, wobei das mindestens eine angiogenetische Protein unter PDGF-A (platelet derived growth factor A), PDGF-B (platelet derived growth factor B), VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGFbeta (tumor growth factor beta), Angiopoetin 1 und Angiopoetin ausgewählt ist.
- 15 3. Mittel nach Anspruch 1, wobei das mindestens eine antiangiogenetische Protein unter VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor 1), Angiostatin, Endostatin sowie Rezeptorenblockern für VEGFR1 und VEGFR2 ausgewählt ist.
4. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem
  - a) in einem Körper durch Implantation von biologisch inertem Material die Bildung von isogenen oder autologen Zellen ausgelöst wird,
  - 25 b) die in Schritt a) gebildeten Zellen aus dem Körper gewonnen werden,
  - c) die in Schritt b) gewonnenen Zellen gentechnisch so verändert werden, daß sie im Falle einer gewünschten Induktion einer Angiogenese mindestens ein angiogenetisches Protein oder im Falle einer gewünschten Inhibition einer Angiogenese mindestens ein antiangiogenetisches Protein exprimieren.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt c) gewonnenen Zellen ein unter PDGF-A (platelet derived growth factor A), PDGF-B (platelet derived growth factor B), VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGF $\beta$  (tumor growth factor beta), Angiopoetin 1 und Angiopoetin ausgewähltes angiogenetisches Protein exprimieren.
6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt c) gewonnenen Zellen ein unter VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor 1), Angiostatin, Endostatin sowie Rezeptorenblockern für VEGFR1 und VEGFR2 ausgewähltes antangiogenetisches Protein exprimieren.
- 15 7. Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder eines nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6 hergestellten Mittels zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese.
8. Verwendung nach Anspruch 7, bei der ein Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6 hergestelltes Mittel in isogenes oder autologes Gewebe des Körpers eingeführt wird, in dem eine Angiogenese induziert oder inhibiert werden soll.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese, ein Verfahren zu dessen Herstellung  
5 sowie dessen Verwendung.